

1967

**Untersuchungen zur  
elektronenmikroskopischen Darstellung  
von Gangliosiden  
in den subzellulären Fraktionen  
des Zentralnervensystems**

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

**ANGELOS CHALARIS**







AUS DER BIOCHEMISCHEN ABTEILUNG (PROFESSOR DR. H. JATZKEWITZ)

AM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE, MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. G. Peters

---

UNTERSUCHUNGEN ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN DARSTELLUNG VON  
GANGLIOSIDEN IN DEN SUBZELLULÄREN FRAKTIONEN  
DES ZENTRALNERVENSYSTEMS

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

A n g e l o s   H a l a r i s

aus Athen

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. H. Jatzkewitz  
Mitberichterstatter: Professor Dr. Th. Bücher  
Dekan: Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.67

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen  
Austauschdienstes

Meinen lieben Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153723\\_0209](https://archive.org/details/IA40153723_0209)

## I n h a l t s v e r z e i c h n i s

|                                                                                  | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Einführung .....                                                                 | 2     |
| Zielsetzung der Arbeit .....                                                     | 10    |
| I. Material und Methodik .....                                                   | 11    |
| 1. Gewinnung von HeLa-Zellen .....                                               | 11    |
| 2. Isolierung der multilamellären Körperchen<br>(MCB) aus Tay-Sachs Gehirn ..... | 11    |
| 3. Darstellung subzellulärer Hirnfraktionen ..                                   | 12    |
| 4. Zusatz von radioaktiven Gangliosiden zum<br>Homogenat .....                   | 12    |
| 5. Extraktion der Ganglioside und ihre<br>Dünnschichtchromatographie .....       | 14    |
| 6. Isolierung von Synapsenbläschen .....                                         | 14    |
| 7. Präparation für die Elektronenmikroskopie .                                   | 15    |
| 8. Spezielle Anfärbung (Hale Stain) für<br>Ganglioside .....                     | 15    |
| 9. Inkubationen mit Neuraminidase .....                                          | 16    |
| 10. Inkubationen mit Hyaluronidase .....                                         | 16    |
| II. Ergebnisse .....                                                             | 17    |
| III. Diskussion .....                                                            | 35    |
| Zusammenfassung .....                                                            | 37    |
| Literaturverzeichnis .....                                                       | 38    |

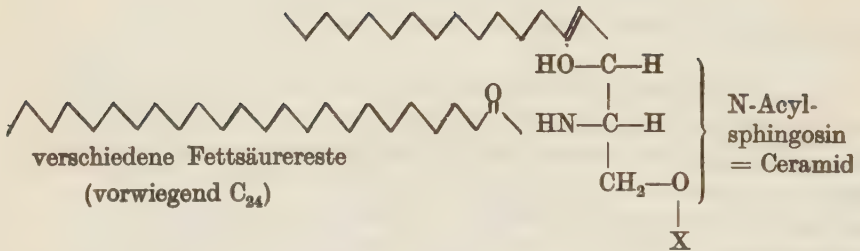


## E i n f ü h r u n g

### a) Aufbau, Vorkommen und Funktion der Ganglioside

Die Ganglioside und Cerebroside gehören zu den Sphingolipoiden, die zusammen mit den Glycerinphosphatiden und den Sterinen die Gruppe der Lipide bilden. Sphingolipide (Abb. 1) sind Derivate des trifunktionellen  $C_{18}$ -Fettaminoalkohols Sphingosin. Die Aminogruppe trägt einen höheren Fettsäurerest in Säureamidbindung (das Amid heißt "Ceramid"). Die endständige primäre Hydroxylgruppe ist bei den Cerebrosiden mit einer Hexose, bei den Cerebroside-sulfaten mit einem Hexosesulfat oder aber mit einem Oligosaccharid glykosidisch verknüpft. Wenn nun an den Oligosaccharidanteil N-Acyl- (meist N-Acetyl-)neuraminsäure (= Sial-säure) gebunden ist, so spricht man von Gangliosiden. Den Sphingoglykolipoiden stehen als einzige Sphingophosphatide die Sphingomyeline gegenüber, die an Stelle des Zuckeranteils esterartig gebundenes Phosphorylcholin enthalten. Alle diese Stoffe können hydrophobe Schichten bilden und sind an der Membranbildung wesentlich beteiligt. Besonders viel Lipide enthält das Nervengewebe, aber auch in Erythrozyten, Milz-, Leber- und Nierengewebe konnten vor allem Sphingolipide nachgewiesen werden.

Die Ganglioside wurden 1942 von Klenk (1) entdeckt, der in der Hirnrinde von an Tay-Sachs'scher Krankheit Verstorbenen eine Gruppe zuckerreicher Sphingolipide isolierte, die er Ganglioside nannte. Die Konstitutionsaufklärung der Ganglioside war lange Zeit unmöglich, weil es sich um ein Gemisch sehr ähnlicher Substanzen handelte, die sich nur mittels spezieller Methoden auftrennen ließen. Erst die Einführung der Säulenchromatographie an Kieselsäure (2), die Anwendung geeigneter Extraktionsmethoden (3 - 7) und die Verwendung der Dünnschichtchromatographie (8 - 11) gestatteten es, saubere Produkte zu gewinnen. Das Grundgerüst der Ganglioside wurde 1963 durch die Arbeiten von Kuhn und Wiegandt (12) bekannt, obwohl früher schon erhebliche Beiträge auf diesem Gebiet von Klenk und Gielen (13) und Svennerholm (14) geleistet worden waren. Zum Aufbau eines Gangliosidmoleküls (Abb. 2) gehören



|                                                                      |                                                                              |                                  |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Sphingo-<br>glyko-<br>lipoide<br>(in glyko-<br>sidischer<br>Bindung) | X = Galaktose (im Gehirn)                                                    | = Galaktocerebrosid              |
|                                                                      | = Glucose (z. B. in Milz)                                                    | = Glucocerebrosid                |
|                                                                      | X = Galaktose-3-sulfat                                                       | = Cerebrosidsulfat<br>(Sulfatid) |
| Sphingo-<br>phosphatid<br>(in Ester-<br>bindung)                     | X = Glucose + Galaktose<br>+ N-Acetylgalaktosamin<br>+ N-Acetylneuraminsäure | = Ganglioside                    |
|                                                                      | X = Phosphorylcholin                                                         | = Sphingomyelin                  |

Abb. 1 Grundstruktur und Klassifizierung der Sphingolipoide

Ceramid (= N-Acetylsphingosin), Glucose, Galaktose, N-Acetyl-galaktosamin und N-Acetylneuraminsäure. An das hydrophobe Ceramid ist eine unverzweigte Zuckerkette gebunden. Die Sialsäure (N-Acetylneuraminsäure) ist mit der mittelständigen Galaktose glykosidisch verbunden. Normalgehirn enthält nur Ganglioside vom Tetrasaccharidtyp in nennenswerter Menge, und zwar solche mit einem, zwei oder drei N-Acetylneuraminsäureresten. Der Fettsäureanteil ist bei den aus Hirnrinde isolierten Gangliosiden Stearinsäure, während die aus Milz und Erythrozyten gewonnenen vorwiegend Lignocerinsäure enthalten. An der Konstitutionsaufklärung von weiteren Gangliosiden arbeiteten Kuhn und Wiegandt (15, 16) und Wiegandt und Baschang (17). Ganglioside haben saure Eigenschaften. Sie sind unlöslich in Äther, Aceton und Essigester, schwerlöslich in Äthanol, etwas leichter in Methanol, leichtlöslich in Gemischen von Benzol-Alkohol oder Chloroform-Alkohol ebenso in Pyridin, Eisessig und Wasser.

Ganglioside finden sich im Gehirn fast ausschließlich in der grauen Substanz (6, 7, 18), am reichlichsten in der Hirnrinde, im Gegensatz zu den vorwiegend in der weißen Substanz lokalisierten Cerebrosiden. Ebenfalls konnte das Vorkommen von Gangliosiden in Erythrozyten (19), Milz (20), Leber, Lunge, Niere, Lymphknoten und in menschlicher Placenta (21) von zahlreichen Untersuchern nachgewiesen werden (22 - 30). Das subzelluläre Vorkommen der Ganglioside im Nervensystem ist ebenfalls intensiv studiert worden, nachdem die Entwicklung geeigneter Trennverfahren (Differential- und Dichtegradientenzentrifugation) eine Isolierung der subzellulären Partikel des Nervensystems gestattete (31 - 34). Ganglioside kommen vorwiegend in der Myelin-, Nervenendigungs-, Mikrosomen- und Synapsenbläschenfraktion vor (31, 34). Über das Vorkommen von Gangliosiden in der Bläschenfraktion herrscht zur Zeit noch keine einheitliche Meinung (34, 76).

Trotz der Fülle der über diese Stoffklasse veröffentlichten Arbeiten ist die Funktion der Ganglioside noch nicht endgültig geklärt. Ganglioside stimulieren das isolierte Ileum des

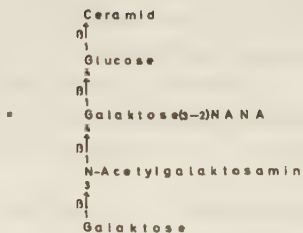
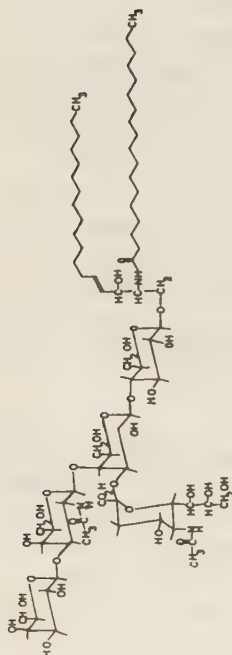


Abb. 2 Konstitution des Hauptmonosialogangliosids  
NANA = N-Acetylneuraminsäure

Meerschweinchen und das isolierte Herz von *Venus mercenaria* (35); sie hemmen die Hämagglutinationsreaktion (36) und die neurotoxischen Effekte im Mäusehirn, die durch zwei Typen des Influenzavirus verursacht werden (37); ferner binden sie Tetanustoxin in vitro (38 - 40) und bilden Komplexe mit anderen Proteinen wie mit dem Toxin von Staphylokokken, dem Neurotoxin von *Shigella shigae* und Proteinen des Blutserums (41, 42). Da der Gangliosidgehalt besonders hoch ist in Hirnregionen, die Neurone enthalten, so im Cortex, Cerebellum, Thalamus, Nucleus caudatus (43), und da pathologische Zustände, die mit einem Verlust an Neuronen einhergehen (44), eine Abnahme in der Konzentration der Hirnganglioside führen, wurde angenommen, daß sie eventuell Transportfunktion in dendritischen Prozessen haben könnten. McIlwain (45) stellte die Hypothese auf, dass Ganglioside am selektiven Kationentransport an der Membran der Nervenzelle beteiligt sein sollten. Der hohe Gangliosidgehalt der Placenta (21) könnte dafür sprechen. Ferner scheint eine Beziehung zu bestehen zwischen dem Gangliosidgehalt des Gehirns und dem  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Blutes. Hyperkapnie und die daraus resultierende respiratorische Azidose - nicht jedoch eine experimentell erzeugte Alkalose - bewirken eine Abnahme des N-Acetylneuraminsäure- und Hexosamingehalts des Gehirns (46). Dabei werden für den zugrunde liegenden Mechanismus durch die Hyperkapnie frei werdende Enzymaktivatoren oder Glykosidasen verantwortlich gemacht (46). R. Burton (47 - 49) hat eine Korrelation zwischen Gangliosid- und Acetylcholin-gehalt der Mitochondrien-, Nervenendigungs- und Synapsenbläschenfraktion festgestellt. Er postuliert eine mögliche Funktion der Ganglioside im Acetylcholintransport an der Synapse.

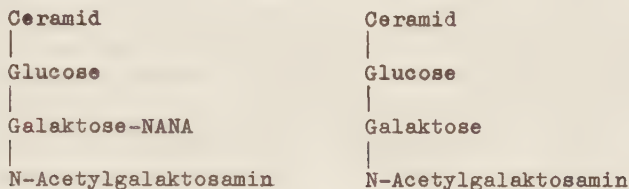
#### b) Speicherung von Gangliosiden

Die pathologische Speicherung von Gangliosiden führt zum Krankheitsbild der amaurotischen Idiotie. Es handelt sich um eine genetisch bedingte Erkrankung mit rezessivem Erbmodus. Wie bei allen bisher bekannten Speicherkrankheiten

mit rezessivem Erbgang kommt es zu einer Anhäufung bestimmter Stoffe im Gewebe, deren physiologischer Abbau infolge einer vererbten Enzymstörung nicht mehr möglich ist. Bisher konnte der bei der zu besprechenden Krankheit ursächliche Enzymdefekt nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß die Kranken eine Zeit lang lebensfähig bleiben, ist wahrscheinlich unter anderem auf das langsame turn-over der Ganglioside (50-54) zurückzuführen (55).

Jede Sphingolipoidose - so auch die amaurotische Idiotie - kann im Kindes-, Jugend- oder Erwachsenenalter auftreten. Die Speicherung einer Sphingolipoidart ist bei den kindlichen Fällen am größten. Bei später einsetzendem Krankheitsverlauf ist sie geringer ausgeprägt. Bei der familiären amaurotischen Idiotie unterscheidet man eine infantile Form - die eigentliche Tay-Sachs'sche Erkrankung -, eine spätinfantile Form, eine juvenile und eine adulte Form. Diese Einteilung erfolgt nicht nur an Hand des klinischen Bildes, sondern wird auch biochemisch (62 - 67) und morphologisch (56 - 61) gestützt. Die infantile Form zeichnet sich durch starke Ganglienzellblähungen aus, die durch Substanzablagerungen in den Zellen verursacht werden. Dabei sind alle Zellen des Nervensystems intensiv befallen. Die juvenile Form zeigt zwar eine ubiquitäre, jedoch weniger intensive Störung aller Gebiete der Großhirnrinde, während Hirnstamm und Rückenmark relativ verschont bleiben. Umgekehrt zeigen bei adulten Formen das Rückenmark, die Medulla oblongata, die Olive und der Thalamus besonders starke Veränderungen, während die Großhirnrinde relativ unversehrt bleibt (56). Bei den kindlichen Fällen von amaurotischer Idiotie vom Typ "Tay-Sachs" wird das Monosialoceramidtrisaccharid (14) - auch Tay-Sachs-Gangliosid genannt - und sein neuraminsäurefreies Derivat (Abb. 3) gespeichert. Sie machen 80 - 90 % der Gesamtganglioside aus, deren Gehalt gegenüber der Norm um das Vier- bis Zehnfache erhöht sein kann. Vielleicht sind auch einige juvenile und adulte Fälle der amaurotischen Idiotie auf die Speicherung von Gangliosiden zurückzuführen. Bei den meisten ist jedoch

die chemische Natur der Speichersubstanzen unbekannt.



(NANA = N-Acetylneuraminsäure)

Abb. 3 Das Tay-Sachs-Gangliosid (links) und sein neuraminsäure-freies Derivat (rechts)

Wie bereits erwähnt, liegen morphologische Befunde vor, die für die verschiedenen Formen der amaurotischen Idiotie mehr oder weniger charakteristisch sind. Als häufigste ultrastrukturelle Erscheinungsform der gespeicherten Substanzen treten bei der klassischen Tay-Sachs'schen Erkrankung multilamelläre Körperchen auf, die von Terry et al. (59) als "membranous cytoplasmic bodies" (MCB) bezeichnet wurden. Es sind 1-1,5  $\mu$  große, rundliche konzentrisch geschichtete Elemente, in welchen die Lamellen einen geradlinigen Verlauf zeigen. Diese Körperchen sind manchmal im Cytoplasma verstreut, öfters jedoch füllen sie ausgedehntere Zellbezirke aus. Durch Differentialzentrifugation konnten diese Gebilde rein gewonnen und biochemisch analysiert werden (59). So wurde gefunden, daß sie zu 90 % aus Lipiden-Gangliosiden, Cholesterin und in geringer Menge Phospholipiden- und zu 10 % aus Eiweiß bestehen.

#### c) Hale Stain

1946 beschrieb Hale (68) eine Methode zur spezifischen histochemischen Darstellung von sauren Polysacchariden im Gewebe mit einer sauren Eisen(III)-hydroxid Lösung (Hale Stain), die von R. Mowry (69) 1958 verbessert wurde. Mowry verwandte zur Darstellung der sauren Polysaccharide das Müller'sche kolloidale

Eisen(III)-oxid. G. Gasic und L. Berwick (70) wendeten 1962 das Hale Stain zum ersten Mal für Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop an, um die neuraminsäurehaltigen Sialomucine an Ascites Tumorzellen darzustellen. Nach Behandlung mit Neuraminidase zeigten sie, daß die Zellen ihren Hale-positiven Mantel verloren hatten. R. Curran et al. (71) benutzten 1965 die gleiche Methode, um die sauren Mucopolysaccharide des Rat Jejunum im Elektronenmikroskop zu lokalisieren.

## Z i e l s e t z u n g   d e r   A r b e i t

Es sollte die subzelluläre Lokalisation der Ganglioside im Nervensystem festgestellt werden mit dem Ziel, nähere Aufschlüsse über ihre Funktion zu gewinnen. Dies war nur bei Vergrößerungen im elektronenmikroskopischen Maßstab zu erwarten. Dafür bot sich die Hale-Färbung an - eine histochemische Methode, die erfolgreich zur elektronenmikroskopischen Darstellung der neuraminsäurehaltigen Sialomucine an Ascites Tumorzellen angewandt worden war (70). Es sollte zunächst die Reproduzierbarkeit des Verfahrens an HeLa-Zellen überprüft werden. Danach sollte versucht werden, das Verfahren auf subzelluläre Fraktionen zu übertragen und zwar zuerst auf eine solche mit hohem Gangliosidgehalt, wie sie die die "membranous cytoplasmic bodies" (MCB) enthaltende Fraktion aus einem an Tay-Sachs'scher Erkrankung befallenen Gehirn darstellt. Sollte dieser Versuch positiv ausfallen, dann ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß mit dem "Hale Stain" wirklich Ganglioside "angefärbt" werden. Jetzt kann das Verfahren auf die isolierten subzellulären Fraktionen des Gehirns übertragen werden. Vorher muß jedoch überprüft werden, ob die Lokalisation der Ganglioside beim Gewinnen der subzellulären Partikel nicht durch unspezifische Adsorption dieser Stoffklasse aus dem Überstand verschleiert wird. Diese Frage sollte durch Zusatz von radioaktiv markierten Gangliosiden zur Gewebesuspension vor der weiteren Aufarbeitung geklärt werden. Schließlich sollte noch mit Hilfe geeigneter Enzyme untersucht werden, in wieweit noch andere saure Substanzen der subzellulären neuralen Strukturelemente Hale-positiv reagieren.

## I. M a t e r i a l   u n d   M e t h o d i k

### 1. Gewinnung von HeLa-Zellen:

Die Zellen stammten aus einem Portiocarcinom. Sie waren im Eagle's Medium gezüchtet worden, wurden mit calciumfreier Lösung gewaschen, anschließend mit Versen abgelöst und zweimal in Hank'scher Gebrauchslösung suspendiert. Über die Behandlung für die Elektronenmikroskopie siehe unten.

### 2. Isolierung der multilamellären Körperchen (MCB) aus Tay-Sachs Gehirn:

Die Isolierung der MCB-Fraktion erfolgte aus einem tiefgekühlten Tay-Sachs Gehirn im wesentlichen nach der Methode von S. Samuels et al. (59). 2 g Cortex wurden in 10 ml Titriplex-Lösung (0,05 M) homogenisiert, 2 Stunden lang gerührt und bei 2000 x g 3 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 7500 x g 5 Min. zentrifugiert. Die Sedimente wurden vereinigt, zweimal gewaschen und in 15 ml wässriger Titriplex-Lösung suspendiert. Jeweils die Hälfte der Suspension wurde auf einen diskontinuierlichen Gradienten gebracht, der aus 12 ml 1,2 M, 12 ml 0,75 M und 12 ml 0,25 M Saccharose-Lösung bestand. Es wurde 75 Min. lang im Ausschwingrotor einer Spinco-L2 Ultrazentrifuge bei 75 000 x g zentrifugiert. Am Ende des Laufes waren deutlich 3 Zonen zu erkennen: Eine hellblaue zwischen der obersten klaren und der 0,25 M Saccharose-Schicht, eine zweite zwischen der 0,25 M und 0,75 M Saccharose-Schicht und eine dritte zwischen der 0,75 M und 1,2 M Saccharose-Schicht. Letztere stellt die MCB-Fraktion dar. Sie wurde mit Titriplex-Lösung (0,05 M) im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei 70 000 x g 30 Min. lang zentrifugiert, um ein Sediment zu gewinnen. Aus dem Sediment wurden Proben für die konventionelle Elektronenmikroskopie und für die Hale-Färbung entnommen.

### 3. Darstellung subzellulärer Hirnfractionen:

Meerschweinchengehirne wurden bei  $0 - 4^{\circ}$  nach der modifizierten Methode von Whittaker, Eichberg, Dawson (34) behandelt. Das Gewebe wurde in eiskalter 0,32 M Saccharose-Lösung im Verhältnis 1:10 (g/v) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei  $1000 \times g$  11 Min. in einer Servall-Zentrifuge zur Gewinnung der Kernfraktion ( $P_1$ ) zentrifugiert. Das Sediment wurde gewaschen durch Suspension in frischer 0,32 M Saccharose-Lösung und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden bei  $17500 \times g$  60 Min. zentrifugiert, um die rohe Mitochondrienfraktion ( $P_2$ ) zu gewinnen. Letztere wurde in 0,32 M Saccharose-Lösung aufgenommen, so daß ein ml zwei g Ausgangsgewebe entsprach. Es wurden 10 ml aus dieser Suspension auf einen diskontinuierlichen Gradienten gebracht, der aus 20 ml 0,8 M Saccharose-Lösung oberhalb von 20 ml 1,2 M Saccharose-Lösung bestand. Dann wurde der Ansatz 2 Stunden lang bei  $53\ 000 \times g$  im Ausschwingrotor einer Spinco-L2 präparativen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach dem Laufe waren drei Banden sichtbar: Fraktion  $P_{2A}$  oder Leichtmyelinfraktion; Fraktion  $P_{2B}$  oder Nervenendigungsfraktion; Fraktion  $P_{2C}$  oder Mitochondrienfraktion. Aus allen drei Fraktionen wurden Proben entnommen für die konventionelle Elektronenmikroskopie und für die Hale-Färbung.

### 4. Zusatz von radioaktiven Gangliosiden zum Homogenat:

#### a) Gewinnung der Fraktionen

Das in Saccharose gelöste radioaktive Gangliosid wurde unter erneutem Homogenisieren dem Hirnhomogenat zugesetzt. Die Abtrennung der subzellulären Fraktionen erfolgte, wie bereits beschrieben. Nach der Fraktionierung der  $P_1$ - und  $P_2$ -Fraktionen sowie nach der Sedimentierung der  $P_3$ -Fraktion wurde der Überstand zur Bestimmung der darin vorhandenen Aktivität aufgehoben. Die gewonnenen Fraktionen wurden unter Zugabe von dest. Wasser bzw. 0,32 M Saccharose-Lösung zur Erhaltung der Isotonie erneut

zentrifugiert, um ein festes Sediment zu gewinnen. Die Überstände wurden vereinigt, während das erhaltene Sediment in 5 ml 0,32 M Saccharose-Lösung resuspendiert wurde. Die eine Hälfte der resuspendierten Fraktion wurde zur Bestimmung des Trockengewichts gegen dest. Wasser dialysiert, die andere zur Gewinnung des Lipoidextraktes verwendet.

#### b) Extraktion der Lipide

Der Fraktionsanteil wurde mit 15 Volumina Chloroform-Methanol (2:1 v/v) vermischt und in einem Wasserbad 5 Min. lang bei 55° erhitzt. Es wurde filtriert und der Rückstand für die weitere Behandlung aufgehoben. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand unter Zusatz von 1 ml Chloroform-Methanol (1:1) unter leichtem Erwärmen aufgelöst. Davon wurde die Aktivität von jeweils 0,2 - 0,5 ml gemessen. Diese Extraktion wurde solange wiederholt, bis die Lösung keine Radioaktivität mehr zeigte. Der dann noch verbleibende Rückstand wurde genau so behandelt wie der aus dem Filtrieren des Lipoidextraktes gewonnene.

#### c) Rückstand

Der Rückstand wurde mit 3 ml 6 n Salzsäure 16 Stunden lang hydrolysiert und dann mit 3 ml 6 n Natronlauge neutralisiert. Danach wurde das Hydrolysat unter Zusatz von 10 ml Chloroform dreimal ausgeschüttelt und die Unterphase abgetrennt. Jede Phase wurde mit Kaliumcarbonat entwässert und die wasserfreie Lösung zur Trockene gebracht. Die Aktivität des Rückstands wurde, wie eben beschrieben, bestimmt.

#### d) Messung im Flüssigkeits-Scintillationszähler

Als Meßgerät diente das Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314 EX. Die Zählflüssigkeit bestand aus 5 g 2,5-Diphenyloxazol (= PPO) und 0,3 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (= Dimethyl-POPOP), in 1 Liter Toluol

gelöst. Die Probengläser enthielten 10 ml aus obiger Lösung, 6 ml Methylcellosolve und 0,2 ml zu messende Lipoidlösung. Die Proben wurden im gekühlten Probensammler des Gerätes 60 Min. lang gelassen und dann 24 Stunden jeweils 10 Min. lang gemessen.

#### 5. Extraktion der Ganglioside und ihre Dünnschichtchromatographie:

Die Ganglioside wurden nach der Methode von Folch, Lees und Sloane-Stanley (3) mit Chloroform-Methanol aus den subzellulären Fraktionen extrahiert; d. h., die in 15 Vol. Chloroform-Methanol (2:1, v/v) suspendierten Fraktionen wurden homogenisiert und in einem Wasserbad bei 55° 5 Min. erhitzt. Das Ungelöste wurde abfiltriert und mehrmals gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden durch ein G 3 Glasfilter filtriert und das Filtrat auf das 20-fache Volumen der Ausgangsfraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) ergänzt. Zusatz von 0,2 Volumina dest. Wassers führte zur Entmischung. Die Oberphasen wurden zur Trockene gebracht und der Rückstand aus den Extrakten der Oberphasen auf Kieselgel G - Platten mit dem Lösungsmittelsystem Propanol-Wasser (70:30, v/v) chromatographiert. Die Substanzen wurden mit Kågi-Miescher-Reagenz (Anisaldehyd-Schwefelsäure in Eisessig) sichtbar gemacht (72).

#### 6. Isolierung von Synapsenbläschen:

Die Isolierung der Synapsenbläschenfraktion erfolgte nach der Methode von Whittaker und Sheridan (73). Sechs Meerschweinchen-gehirne wurden mit einem Medianschnitt über den Vierhügelplatten entfernt und die weiße Substanz mittels stumpfer Pinzette weitgehend abgetragen. Die graue Substanz wurde mit dem 10-fachen Volumen ihres Gewichtes an 0,32 M Saccharose-Lösung nach Potter-Aldridge bei 840 U/Min. homogenisiert. Der Abstand zwischen Homogenisatorgefäß und Pistill betrug immer 0,25 mm. Das Homogenat wurde in einer Servall-Zentrifuge 11 Min. lang bei 1000 x g zentrifugiert, um einen Überstand zu gewinnen. Letzterer wurde 20 Min. lang bei 10 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde

mit gleicher Menge Saccharose resuspendiert und 30 Min. bei 10 000 x g abzentrifugiert. Zur Herauslösung der Synapsenbläschen aus dem Zellverband erfolgte nunmehr der osmotische Schock durch Zusatz von 2 ml dest. Wassers pro g grauer Substanz und Resuspension. Das gewonnene Homogenat wurde im Saccharose-Gradienten in die verschiedenen Fraktionen aufgetrennt: Es wurden pro Becher je nach Menge des Homogenats (5 - 10 ml) zwischen 5 und 10 ml 1,6 M Saccharose-Lösung unterschichtet, während der Gradient selbst aus 40 ml einer 0,8 bis 0,4 M Saccharose-Lösung bestand. Für die Gewinnung der Synapsenbläschen wurde der beschickte Gradient im Ausschwingrotor einer Spinco-L2 präparativen Ultrazentrifuge 187 Min. bei 60 000 x g zentrifugiert. Die Bläschenfraktion war als hellblaue Zone in Höhe der 0,4 bis 0,5 M Saccharose-Lösung im seitlich einfallenden Licht bei schwarzem Hintergrund gut erkennbar. Die Fraktion wurde vorsichtig mittels einer Pipette abgezogen. Je 3 ml aus der Bläschenfraktion wurden mit 1 ml dest. Wasser versetzt und im Titan-Rotor der Spinco-L2 Ultrazentrifuge 60 Min. lang bei 125 000 x g sedimentiert.

#### 7. Präparation für die Elektronenmikroskopie:

Die mittels einer Öse aus dem jeweiligen Sediment entnommenen Proben wurden in Glutar(di)aldehyd bei 0° fixiert, in Waschlösung (Sörensenpuffer und Saccharose) gewaschen und in einer 1 %igen Osmiumsäure-Lösung zusätzlich fixiert. Nach der Dehydrierung in Äthanol wurden die Präparate in Epon 812 eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Reichert-Ultramikrotom angefertigt, mit Bleicitrat nach E. Reynolds (74) nachkontrastiert und mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop untersucht.

#### 8. Spezielle Anfärbung (Hale Stain) für Ganglioside:

Die Herstellung des Müller'schen kolloidalen Eisens erfolgte nach der Methode von R. Mowry (69): Es wurde eine 29 %ige

Eisen(III)-chlorid-Lösung hergestellt. 4,4 ml dieser Lösung wurden in 250 ml siedendes destilliertes Wasser hineinpipettiert und kurz gerührt. Von der kolloidalen Eisenlösung wurden 20 ml mit 15 ml dest. Wasser und 5 ml Eisessig versetzt. Der pH-Wert der verdünnten Lösung betrug 1,1 bis 1,3.

Die in Glutar(di)aldehyd fixierten Präparate wurden erst in Waschlösung, dann in 12 %iger Essigsäure gespült. Sie wurden danach 60 bis 90 Min. mit der verdünnten kolloidalen Eisenlösung geschüttelt, viermal in 12 %iger Essigsäure gespült und 30 Min. in einem frischbereiteten Gemisch aus 2 %iger Salzsäurelösung und 2 %iger Kaliumferrocyanid-Lösung im Verhältnis 1:1 nachgefärbt. Die Dehydrierung und Einbettung erfolgte wie oben. Die ultradünnen Schnitte wurden 12 Min. lang mit Bleicitrat nachkontrastiert.

#### 9. Inkubationen mit Neuraminidase:

Das Enzym (Serva Entwicklungslabor Heidelberg) stammte aus *Vibrio Cholerae*. Als Lösungsmittel diente 0,05 M Natriumacetat-Essigsäure-Puffer vom pH 5,5; 1 ml enthielt 500 Einheiten und setzte 500 µg N-Acetylneuraminsäure in 15 Min. bei 37° aus Orosomucoid frei. Die in Glutaraldehyd fixierten Proben wurden wiederholt gewaschen und unter Zusatz von 0,25 ml Enzymlösung pro 5 mg Feuchtgewicht 45 Min. lang bei 37° inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben gründlich mit Waschlösung über Nacht gewaschen. Die weitere Behandlung erfolgte wie üblich.

#### 10. Inkubationen mit Hyaluronidase:

Das aus Schaf-Testes gewonnene Enzym wurde aus dem Serva Entwicklungslabor Heidelberg bezogen. 1 mg des lyophilisierten Pulvers entsprach 500 IE.

Der Inkubationspuffer wurde folgendermaßen hergestellt: 250 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei) und 820 mg NaCl wurden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt (pH 6,3). Von diesem Puffer wurden 25 ml mit bidest. Wasser verdünnt. Darin wurde das Enzym gelöst (50 IE/ml).

Die Proben wurden unter Zusatz von 250 IE Enzym in 5 ml Pufferlösung pro 5 mg Feuchtgewicht 90 Min. bei 38° inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben.

## II. E r g e b n i s s e

Zuerst wurde die Reproduzierbarkeit der "Hale"-Färbung an HeLa-Zellen aus einem Portiocarcinom überprüft, welche neuraminsäurehaltig sind. Wie die Abb. 4 zeigt, sind die Tumorzellen von einzelnen Ferriferrocyanidkristallen wie auch von Kristallaggregaten an ihrer Oberfläche umgeben. Die Kristallbildung bleibt aus, wenn die Zellen nach der Fixierung mit Glutaraldehyd und vor der Behandlung mit der kolloidalen Eisenlösung mit Neuraminidase inkubiert werden (Abb. 6).

Gelegentlich sind Kristallaggregate, die in keinerlei Beziehung zu den benachbart liegenden Zellen stehen, in den interzellulären Räumen zu sehen, wohl durch noch positiv reagierende Abbauprodukte bedingt. Darüber hinaus erfahren die Zellen eine Auflösung ihrer Struktur, da wahrscheinlich die in der äusseren Membran lokalisierten Glykoproteide wesentlich für die Integrität der Struktur verantwortlich sind. Zur Kontrolle wurden die HeLa-Zellen noch mit Hyaluronidase sowie Phosphatpuffer inkubiert. In beiden Fällen tritt eine positive Hale-Reaktion auf, trotz der strukturellen Veränderung, die die Zellen bei der Inkubation erfahren (Abb. 5).

Dann wurde dünnschichtchromatographisch überprüft, ob nach der für die Hale-Färbung erforderlichen Prozedur der Gangliosidgehalt des Gewebes zumindest qualitativ unverändert bleibt. Abb. 7 zeigt ein Chromatogramm vor und nach der Behandlung: Es ist kein Unterschied festzustellen.

Um die Frage zu klären, ob die in den subzellulären Fraktionen dargestellten Ganglioside nicht durch unspezifische Adsorption während der Aufarbeitung aus dem Gewebeüberstand herrühren, wurde radioaktiv markiertes Gangliosid zum Hirnhomogenat hinzugesetzt. Vor den Hauptversuchen wurde der Quencheffekt von Zählflüssigkeit, Lipoidextrakt, Saccharose und Chloroform-Methanol bestimmt und bei der Aufstellung der Ergebnisse berücksichtigt. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der an drei Fraktionen studierten Effekte. Bei allen Untersuchungen wurden 80 % der zugesetzten Aktivität in der Überstandsflüssigkeit wiedererhalten. Die Aktivität, die für die drei in der Tabelle angegebenen Fraktionen (Myelin, Nervenendigungen, Mikrosomen) gemessen wurde, ist geringfügig und gruppiert sich um die

| Radioaktives<br>Gangliosid                 | Zugesetzte<br>Impulse<br>pro Minute | Ausgangs-<br>gewebe in<br>g | Aktivität der Überstände bei |                                     |                                       | Aktivität der Fraktionen |                 |                            |                 |                 |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
|                                            |                                     |                             | Kern-<br>Frak-<br>tionier.   | Mito-<br>chondrien-<br>Fraktionier. | Mikro-<br>somen-<br>Frak-<br>tionier. | Gesamt                   | Myelin          | Nerven-<br>endi-<br>gungen | Mikro-<br>somen | Gesamt          |
| 8 µg<br>Tay-Sachs-<br>Gangliosid           | 125000                              | 9,5                         | 4665                         | 3568                                | 92124                                 | 100357<br>= 80%*         | 645<br>= 0,5%*  | 1105<br>= 0,9%*            | 4223<br>= 3,4%* | 5973<br>= 4,8%* |
| 5 µg<br>Tay-Sachs-<br>Gangliosid           | 73000                               | 11                          | 3417                         | 2616                                | 52540                                 | 58573<br>= 80%*          | 1001<br>= 1,4%* | 916<br>= 1,2%*             | 941<br>= 1,3%*  | 2858<br>= 3,9%* |
| 9 µg<br>Hauptmono-<br>sialo-<br>gangliosid | 47000                               | 10                          | 2187                         | 1785                                | 33750                                 | 37722<br>= 80%*          | 190<br>= 0,4%*  | 1026<br>= 2,2%*            | 690<br>= 1,4%*  | 1906<br>= 4%*   |

\* Prozentsatz der Aktivität der Überstände bzw. der Fraktionen bezogen auf die zugesetzte Aktivität

Tabelle 1 - Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen subzellulären Fraktionen von Meerschweinchen-  
gehirnen nach Zusatz von tritiummarkierten Gangliosiden zum Rohhomogenat

| Zugesetztes<br>radioaktives<br>Gangliosid                  | Feuchtweght der<br>Fraktionen in g |                            | Trockengewicht der<br>Fraktionen in g |        | Impulse pro mg<br>Trockengewicht |                 |        |                            |                 |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------|----------------------------------|-----------------|--------|----------------------------|-----------------|
|                                                            | Myelin                             | Nerven-<br>endi-<br>gungen | Mikro-<br>somen                       | Myelin | Nerven-<br>endi-<br>gungen       | Mikro-<br>somen | Myelin | Nerven-<br>endi-<br>gungen | Mikro-<br>somen |
| 8 µg<br>Tay-Sachs-<br>Gangliosid<br>(125000 Imp./Min.)     | 1,8                                | 2,85                       | 0,3                                   | 0,171  | 0,133                            | 0,028           | 3,7    | 8,3                        | 150,8           |
| 5 µg<br>Tay-Sachs-<br>Gangliosid<br>(73000 Imp./Min.)      | 1,656                              | 1,998                      | 0,350                                 | 0,140  | 0,086                            | 0,028           | 7,1    | 10,6                       | 33,6            |
| 9 µg<br>Hauptmono-<br>sialogangliosid<br>(47000 Imp./Min.) | 1                                  | 1,470                      | 0,380                                 | 0,121  | 0,159                            | 0,036           | 1,5    | 6,4                        | 19,1            |

Tabelle 2 - Spezifische Aktivität dreier subzellulärer Fraktionen des Gehirns  
(in Impulsen pro Min. pro mg Trockengewicht)

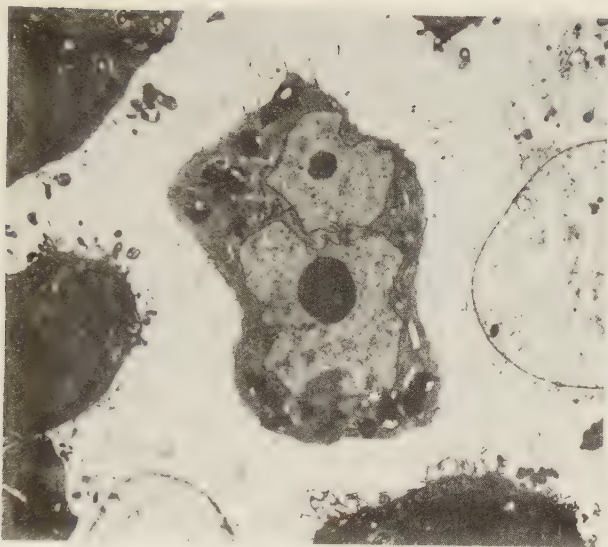


Abb. 4a HeLa-Zellen, mit Osmiumsäure nachfixiert.  
12000fache Vergrößerung.

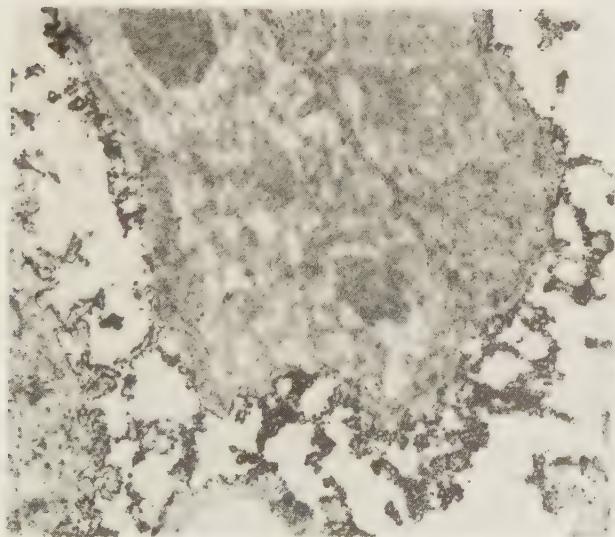


Abb. 4b HeLa-Zellen nach Hale-Färbung. 12000fache Vergrößerung.

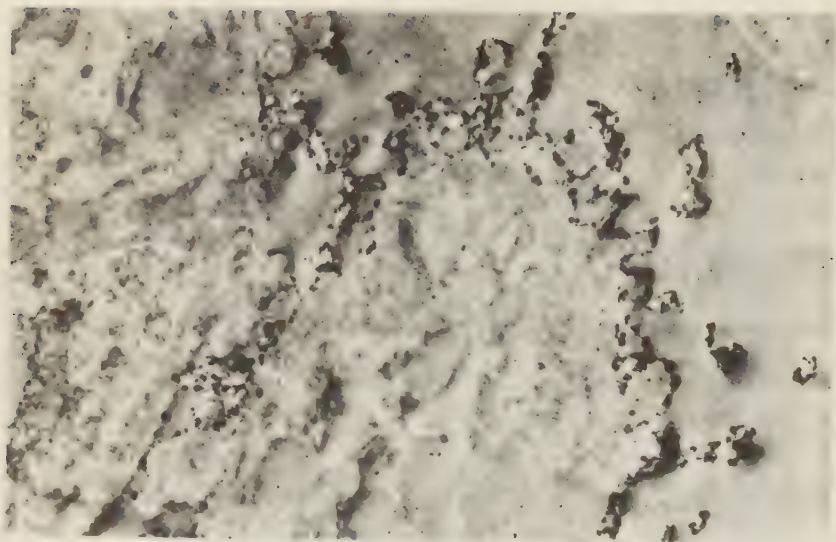


Abb. 5 HeLa-Zellen nach Inkubation mit Phosphatpuffer  
(Hale-Färbung). 18000fache Vergrößerung.



Abb. 6 HeLa-Zellen nach Inkubation mit Phosphatpuffer und  
Neuraminidase (Hale-Färbung). 18000fache Vergrößerung.

Werte von 1 %. Insgesamt wurden in allen isolierten Partikelfraktionen 12 % der eingesetzten Aktivität wiedergewonnen. Die restlichen 8 % sind auf Verluste, die während der Aufarbeitung entstanden sind, zurückzuführen. Tabelle 2 zeigt die Verhältnisse bezogen auf 1 mg Trockensubstanz je Fraktion. Danach sieht es so aus, als ob die Mikrosomenfraktion eine größere Affinität zu den zugesetzten aktiven Gangliosiden hätte. Doch können die in der Tabelle aufgeführten Werte nur Anhaltspunkte sein. Für genaue Angaben wäre das Studium der Adsorptionseffekte in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge radioaktiver Substanz nötig.

Um zu sehen, ob die Neuraminsäure im Gangliosidmolekül ebenfalls Hale-positiv reagiert, und um zugleich einen gewissen Aufschluß zu bekommen über die Spezifität der Färbung, wendeten wir das Verfahren zunächst auf die cytoplasmatischen multilamellären Körperchen ("membranous cytoplasmic bodies" = MCB) an, die aus einem Gehirn eines an Tay-Sachs'scher Erkrankung Gestorbenen isoliert wurden. Diese Gebilde enthalten zu 35 - 50 % ihres Trockengewichts Ganglioside (59) und kaum andere Stoffe, die eine Aussage über die Spezifität der Färbung erschweren würden. Abb. 8 zeigt die MCB - Fraktion, mit Osmiumsäure nachfixiert. Man erkennt die konzentrisch geschichteten multilamellären Körperchen wie sie von R. Terry und S. Korey (75) und S. Samuels, S. Korey et al. (59) beschrieben wurden. Aus der gleichen Fraktion wurden Proben nach der Hale-Methode behandelt (Abb. 9). Dabei fällt auf, daß aus der zwiebelartigen Struktur der multilamellären Körperchen nur noch gesprengte Membranringe übrig geblieben sind. Diese Änderung in der Struktur könnte durch die stark saure kolloidale Eisenlösung bedingt sein. Bei der stärkeren Vergrößerung (Abb. 10) kann man die Doppelmembran deutlich erkennen, sowie aneinandergereihte quadratische Kristalle. Ihre Messung ergab eine Kantenlänge von etwa 400 Å.

Nachdem durch diese Ergebnisse bewiesen worden ist, daß die Hale-Färbung auf subzelluläre Fraktionen übertragen werden kann, und zum anderen, daß sie Ganglioside spezifisch anfärbt, wurde sie auf subzelluläre Fraktionen übertragen, die präparativ

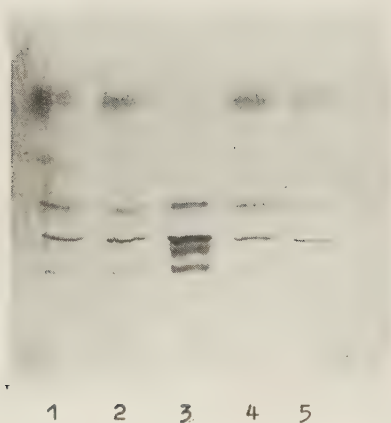


Abb. 7 Dünnschichtchromatogramm der Oberphase nach Extraktion der Lipide aus der Nervenendigungsfraktion.

1 und 2: Chromatogramm der Oberphase vor der Hale-Färbung

3 : Testgemisch aus vier Gangliosiden

4 und 5: Chromatogramm der Oberphase nach der Hale-Färbung

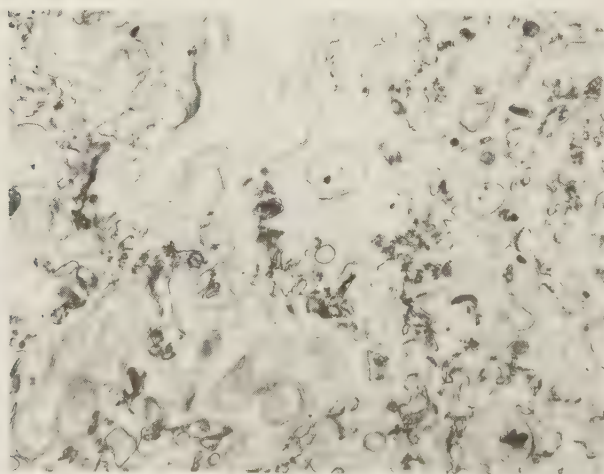


Abb. 8 Die Fraktion der cytoplasmatischen multilamellären

Körperchen (MCB).mit Osmiumsäure nachfixiert. x 12000

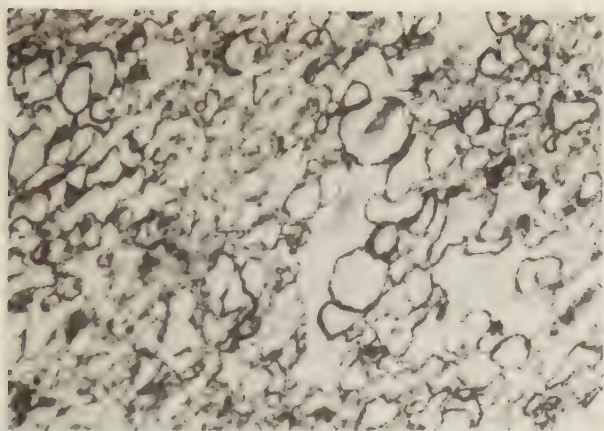


Abb. 9 Dieselbe Fraktion nach der Hale-Färbung. 12000fache Vergrößerung.

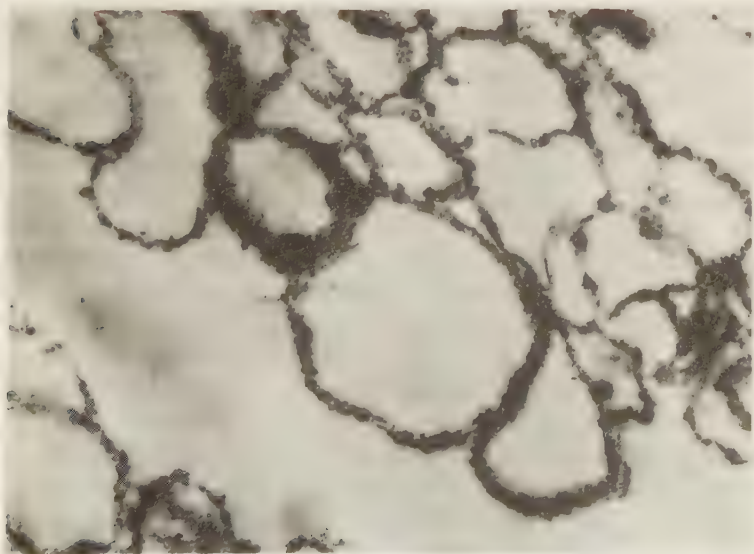


Abb. 10 Ausschnitt aus der MCB - Fraktion bei 54000facher Vergrößerung.

aus Gehirnen von Meerschweinchen gewonnen wurden. Wir untersuchten die Nervenendigungen, Mitochondrien und Synapsenbläschen. Mikrosomen und Myelin veränderten ihre Struktur nach der Behandlung mit der sauren Lösung so stark, daß eine native Darstellung der Ganglioside unmöglich war. Aus jeder Fraktion wurden Proben a) mit Osmiumsäure fixiert, b) nach der Hale-Färbung ohne Osmiumsäure behandelt und c) wie b), jedoch ohne Exposition mit kolloidaler Eisenlösung, um die Möglichkeit unspezifischer Artefakte auszuschalten.

Einige Fraktionen waren in geringem Maße mit anderen kontaminiert. Die Kontamination störte nicht die eindeutige Aussage über die Lokalisation der Hale-positiven Substanzen, sondern unterstützte sie sogar. Abb. 11 zeigt die Nervenendigungsfraktion, mit Osmiumsäure nachfixiert. Nach Hale-Färbung (Abb. 12) kommt es zu einer Schwärzung der Membranen. Schon bei der geringeren Vergrößerung (Abb. 12) kann man wiederum Kristalle erkennen, die der äußeren Membran aufsitzen. Durch die erhöhte Nachkontrastierungszeit der Schnitte mit Bleicitrat treten an manchen Stellen Struktureinheiten hervor wie z.B. Synapsenbläschen innerhalb der Nervenendigungen. Die Intensität der Hale-Färbung in der Membran der Nervenendigungen rührt mit großer Wahrscheinlichkeit von ihrem hohen Gangliosidgehalt her (34).

Im Gegensatz dazu enthält die Mitochondrienfraktion einen geringen Gangliosidgehalt (34), der wahrscheinlich durch die Kontamination mit Nervenendigungen verursacht wird (Abb. 13). Trotzdem ergibt die Hale-Behandlung eine stark positive Reaktion (Abb. 14 und 15). Wiederum sitzen der äußeren Membran Kristalle auf, welche dieselbe Struktur aufweisen wie bei den vorherigen Bildern. An manchen Stellen sind die Cristae deutlich zu sehen. Aus der Abb. 15 wird ersichtlich, daß das Eindringungsvermögen des kolloidalen Eisens relativ gering ist, so daß man beim Anfertigen der Schnitte darauf achten muß, die Randzonen zu erfassen, welche die Anfärbung am deutlichsten zeigen. In der Abb. 15 kann man eine Nervenendigung erkennen, in derer Innerem das zugehörige Mitochondrion sitzt. Beide Gebilde weisen an ihrer Außenmembran eine stark positive Reaktion auf. Durch einen Defekt an der Membran scheint dem Eisen der Weg bis zum Mitochondrion erleichtert worden zu sein.

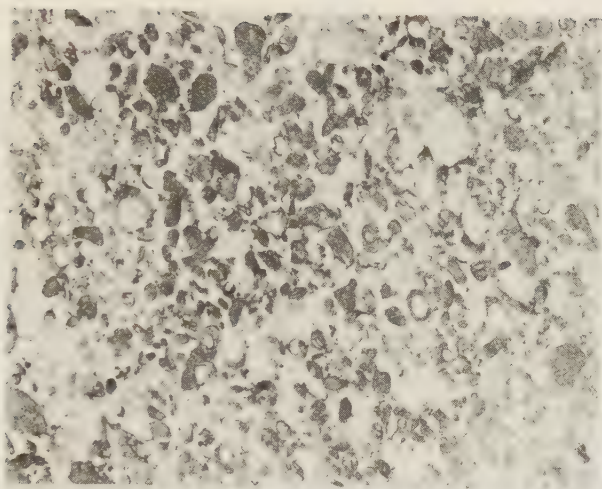


Abb. 11 Die Nervenendigungsfraktion, osmiumfixiert.  
12000fache Vergrößerung.

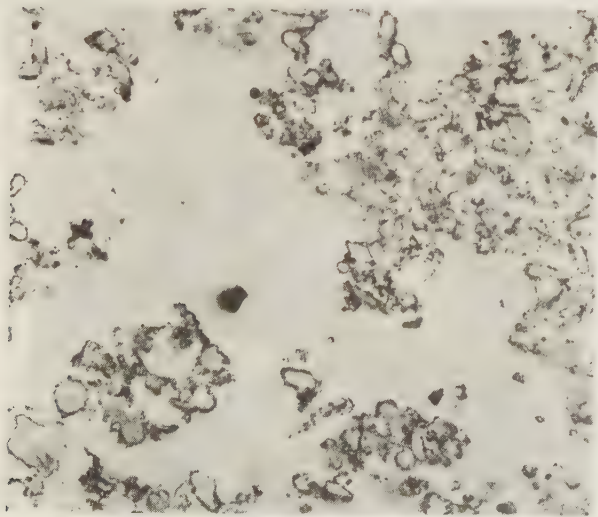


Abb. 12 Dieselbe Fraktion nach Hale-Färbung.  
12000fache Vergrößerung.

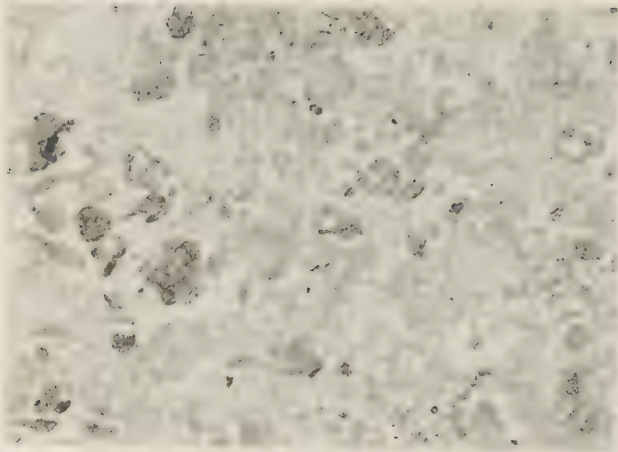


Abb. 13 Mitochondrienfraktion, mit Osmiumsäure nachfixiert.  
12000fache Vergrößerung.

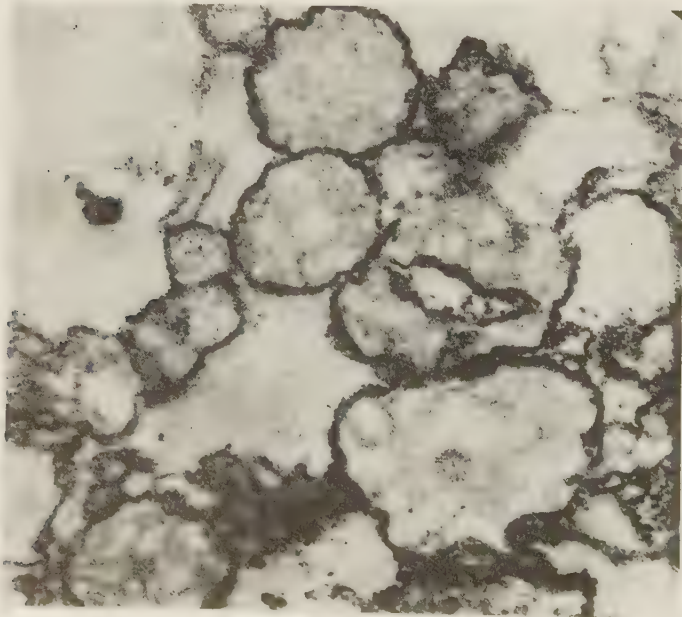


Abb. 14 Mitochondrienfraktion nach Hale-Färbung. 54000fache  
Vergrößerung.

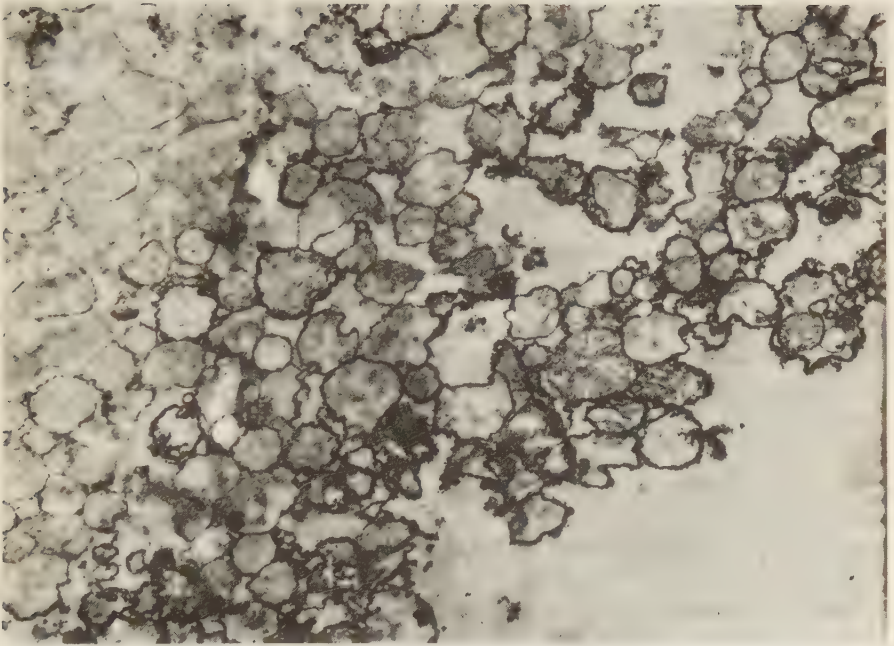


Abb. 15 Mitochondrienfraktion nach Hale-Färbung. Rechts im Bild ist eine Nervenendigung mit dem zugehörigen Mitochondrion zu erkennen. 18000fache Vergrößerung.

Die Frage, ob die Synapsenbläschen Ganglioside enthalten (34) oder nicht (76), veranlaßte uns, die Hale-Färbung auf diese Fraktion anzuwenden. Ihre Isolierung erfolgte aus Meerschweinchen Cortex, wie unter Methodik beschrieben. Abb. 16 zeigt den hohen Reinheitsgrad der Fraktion. Abb. 17 zeigt eine Probe aus derselben Fraktion nach der Hale-Färbung. Im Gegensatz zu den früheren Bildern, wo die Ferriferrocyanidkristalle aneinandergereiht der Membran aufsaßen, sieht man jetzt Konglomerate von Kristallen, ohne daß sonstige Strukturen zu erkennen sind. Dies ist so zu erklären, daß die Kantenlänge eines Kristalls 400 Å, der Durchmesser von einem Bläschen jedoch 350 - 400 Å beträgt.

Beim Test von wässrigen Lösungen verschiedener Substanzen ergab sich, daß Ganglioside und saure Mucopolysaccharide, nicht jedoch neuraminsäurefreie Gangliosidreste mit der Hale-Methode positiv angefärbt werden. Demnach erschien eine Differenzierung der Stoffklassen mit enzymatischen Methoden notwendig.

Die Nervenendigungs- und Mitochondrienfraktion wurden deshalb mit Neuraminidase und Hyaluronidase behandelt. Beide Enzyme sollten die Gangliosidanfärbung im Gegensatz zur sauren Mucopolysaccharidanfärbung unbeeinträchtigt lassen.

Abb. 18 zeigt die Nervenendigungsfraktion nach Inkubation mit Neuraminidase, welche die Intensität der Färbung kaum reduziert, obwohl eine gewisse Beeinträchtigung der Struktur deutlich wird. Ebenfalls ruft die Behandlung mit Hyaluronidase keine Veränderung hervor.

Anders jedoch verhielt sich die Mitochondrienfraktion. Hierbei zeigt sich ebenfalls keine morphologische Veränderung nach Behandlung mit Neuraminidase, wohl aber nach der Einwirkung von Hyaluronidase. Abb. 19 zeigt die mit Osmiumsäure fixierte Fraktion nach Hyaluronidase-Behandlung. Man kann erkennen, daß manche Mitochondrien intakt sind, manche deformiert und manche vollkommen zerfallen sind. Zur Differenzierung kann am gleichen Bild festgestellt werden, daß die kontaminierenden Nervenendigungen der Hyaluronidase-Wirkung resistent bleiben.

Abb. 20 zeigt dieselbe Fraktion nach der Hale-Färbung. Man erkennt, daß der dunkle Mantel an der Mitochondrienmembran

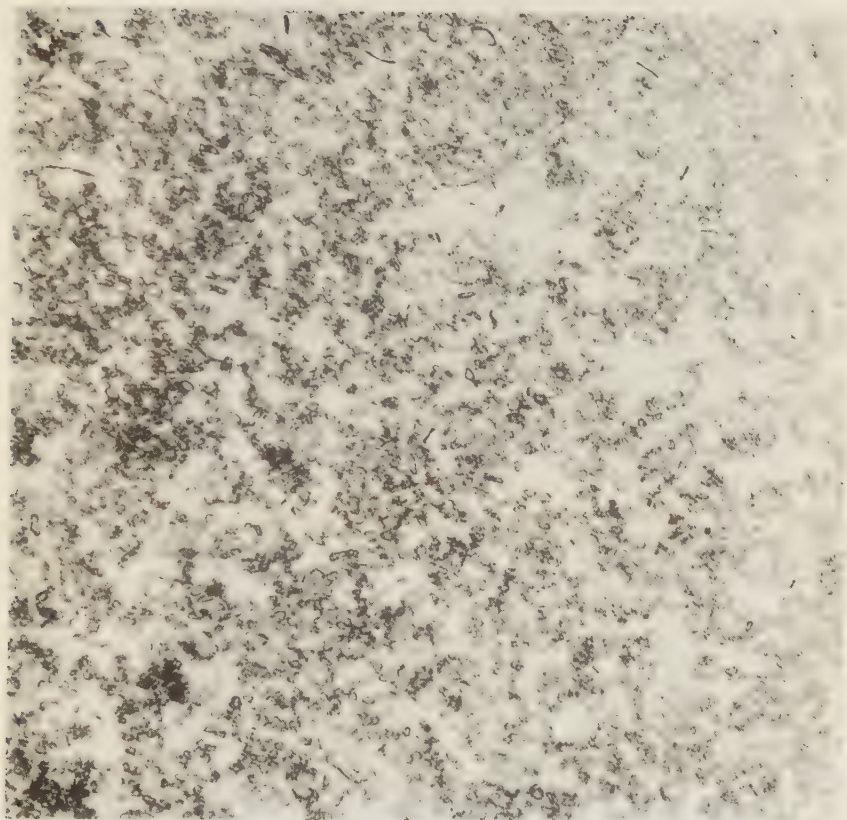


Abb. 16 Synapsenbläschenfraktion, mit Osmiumsäure nachfixiert.  
54000fache Vergrößerung.

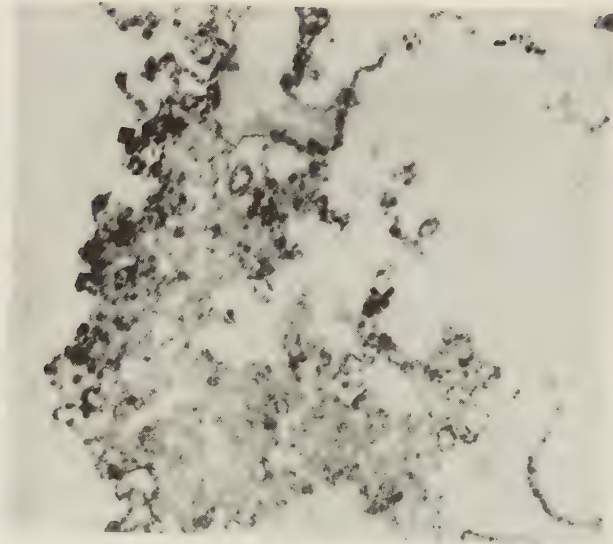


Abb. 17 Synapsenbläschenfraktion nach Hale-Färbung.  
12000fache Vergrößerung.

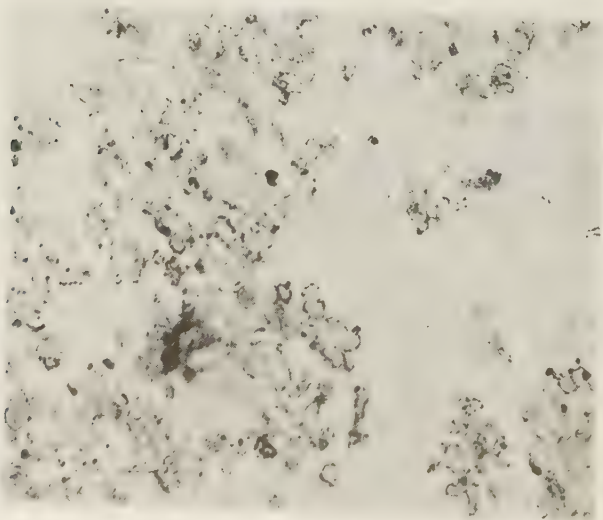


Abb. 18 Nervenendigungsfraktion nach Inkubation mit Neuraminidase  
und nach Hale-Färbung. 12000fache Vergrößerung.

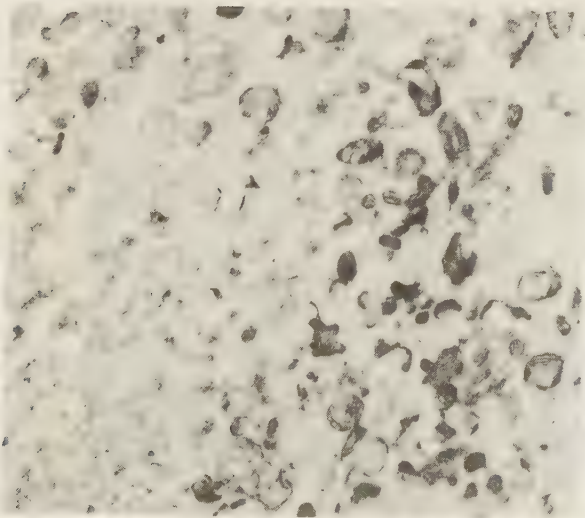
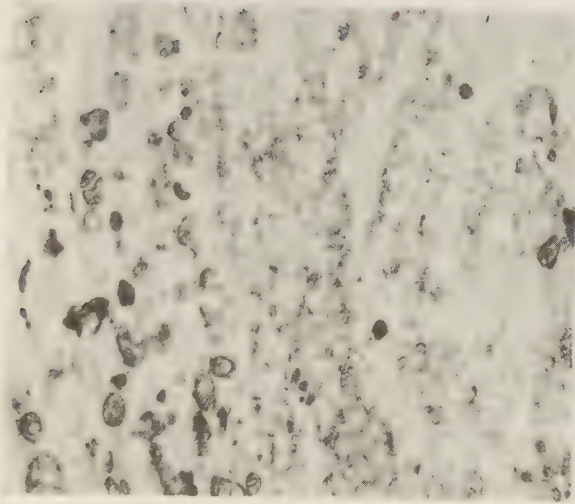


Abb. 19 Zwei Ausschnitte aus der osmiumfixierten Mitochondrien-  
fraktion nach Inkubation mit Hyaluronidase.  
12000fache Vergrößerung.

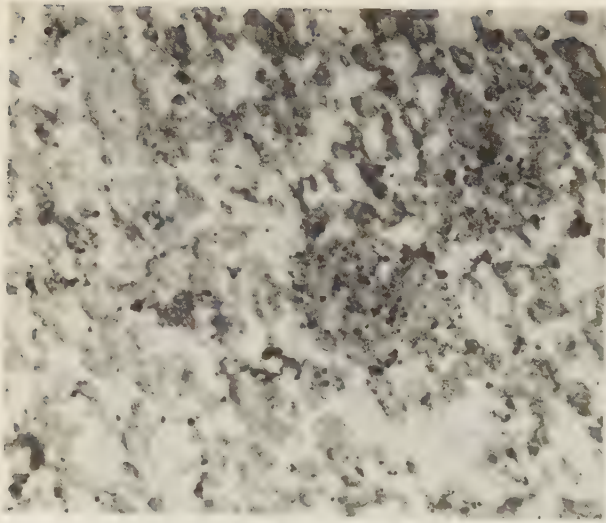


Abb. 20 Zwei Ausschnitte aus der Mitochondrienfraktion nach Inkubation mit Hyaluronidase und nach Hale-Färbung. 12000fache Vergrößerung.

verschwindet und daß im Bereich der Abbauzone einige Kristalle erscheinen. Demnach reagiert die Hyaluronidase mit einem Halpositiven Bestandteil der äußeren Membran, der für die Aufrechterhaltung ihrer Struktur notwendig ist.

### III. D i s k u s s i o n

Die elektronenmikroskopische Darstellung der isolierten cytoplasmatischen multilamellären Körperchen, die aus dem Gehirn eines an Tay-Sachs'scher Erkrankung Gestorbenen gewonnen wurden, beweist, daß mit der modifizierten Hale-Methode die neuraminsäurehaltigen Ganglioside spezifisch angefärbt werden können, weil diese Körperchen zu 35 - 50 % aus Gangliosiden bestehen. Der Zusatz von radioaktiven Gangliosiden zum Hirnhomogenat bei der Aufarbeitung der subzellulären Partikel zeigt, daß die subzelluläre Lokalisation der Ganglioside im Gehirn nicht durch unspezifische Adsorptionseffekte verschleiert wird.

Für die Präparation sind einige Vorschriften zu beachten: So sind die Fraktionsblöcke so klein wie möglich zu halten und beim Schneiden die Randzonen miteinzubeziehen, um dem schlechten Penetrationsvermögen des Eisens Rechnung zu tragen. Die Glutaraldehydfixierung wurde der Formalinfixierung vorgezogen, weil sie eine bessere Gewebserhaltung gewährleistet. Die Expositionszeit der Eisenlösung wurde bis auf 90 Minuten und die der Kaliumferrocyanidlösung auf 30 Minuten erhöht. Die Behandlung mit Kaliumferrocyanid ist empfehlenswert, um Artefakte und Fehlschlüsse zu vermeiden. Die ultradünnen Schnitte wurden mit Bleicitrat 12 Minuten lang nachkontrastiert, um die Grundstrukturen sichtbar zu machen.

Die Anfärbung mit der stark sauren Lösung verändert einige subzelluläre Strukturen wie die der Mikrosomen und die der Myelinfraktion des Gehirns so, daß die native Fixierung der Ganglioside nicht mehr gegeben ist. Selbst wenn man, wie Gasic und Berwick (70) empfehlen, den pH-Wert der Färbelösung bei 1,1 bis 1,3 hält, so reagieren doch eine Reihe von anderen Stoffen als nur neuraminsäurehaltige mit der Eisenlösung. Chemische Untersuchungen zeigen, daß hier in erster Linie die sauren Mucopolysaccharide in Frage kommen. Um zu differenzieren, sind daher Enzyminkubationen notwendig. Wir benutzten die Neuraminidase und die Hyaluronidase und konnten damit zeigen, daß die Membran der Nervenendigungen mit hoher Wahrscheinlich-

keit Ganglioside enthält, während der Hale-positive Mantel der Mitochondrien Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat enthalten kann. Interessanterweise scheinen diese sauren Inhaltsstoffe für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienstruktur notwendig zu sein. Auch die Synapsenbläschen reagieren Hale-positiv, doch kann man über die dafür verantwortliche Stoffklasse keine näheren Angaben machen, weil die Labilität der Gebilde eine Differenzierung mit den beiden Enzymtests nicht erlaubt.

Mit großer Wahrscheinlichkeit sitzen die Ganglioside auf der Doppelmembran der cytoplasmatischen multilamellären Körperchen und auf der Membran der Nervenendigungen. Da die Ganglioside ein niedriges turn-over (50 - 54) im subzellulären Hirngewebe aufweisen, kann man sich ihre Teilnahme an rasch ablaufenden Prozessen des Nervensystems nur unter der Voraussetzung vorstellen, daß sie chemisch nicht verändert werden. Vielleicht sind sie eine Art biologischer Ionenaustauscher für organische und anorganische Kationen. Vielleicht sind sie notwendig für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion spezieller Membranen.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde versucht, die Reaktion von kolloidalem Eisen mit neuraminsäurehaltigen Sialomucinen, wie sie bei der Hale-Färbung (Hale Stain) beschrieben worden ist, zur elektronenmikroskopischen Darstellung der ebenfalls neuraminsäurehaltigen Ganglioside in den subzellulären Fraktionen des Gehirns anzuwenden. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens an HeLa-Zellen überprüft, welche bekanntlich von einem neuraminsäurehaltigen Mantel umgeben sind. Dann wurde das Verfahren auf die aus Gehirnen an Tay-Sachs'scher Krankheit Verstorbener isolierten cytoplasmatischen multilamellären Körperchen ("membranous cytoplasmic bodies") mit hohem Gangliosidgehalt (35-50 %) übertragen. Nach dem positiven Ausfall der Reaktion wurde mit Hilfe radioaktiv markierter Ganglioside überprüft, ob bei der Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus Meerschweinchengehirn nach Whittaker Ganglioside nicht unspezifisch subzellulär adsorbiert werden. Eine nennenswerte unspezifische Adsorption konnte ausgeschlossen werden. Weiterhin dienten zur Differenzierung von anderen möglicherweise Hale-positiven sauren Substanzen Enzyminkubationen mit Neuraminidase und Hyaluronidase. Aus den Versuchen konnte abgeleitet werden a) daß die Hale-Färbung für Ganglioside spezifisch ist b) daß sie auf der Oberfläche der Membran von den multilamellären Körperchen und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf der Membran der Nervenendigungen lokalisiert sind c) daß die Synapsenbläschen eine positive Reaktion ergeben, die jedoch nicht mit Sicherheit auf vorhandene Ganglioside zurückgeführt werden kann d) daß die äussere Membran der Mitochondrien saure Mucopolysaccharide enthält, die für ihre strukturelle Integrität mit verantwortlich sind.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. 273,76 (1942)
- 2) E. Klenk, W. Gielen, Hoppe-Seylers Z. 326,155 (1961)
- 3) J. Folch, M. Lees, G. Sloane Stanley, J. biol. Chem. 226,  
497 (1957)
- 4) E.G. Trams, C. Lauter, Biochim. Biophys. Acta 60,350 (1962)
- 5) K. Suzuki, Life Sciences 3,1227 (1964)
- 6) K. Suzuki, J. Neurochem. 12,629 (1965)
- 7) L. Svennerholm, J. Neurochem. 11,839 (1964)
- 8) H. Jatzkewitz, E. Mehl, Hoppe-Seylers Z. 320,251 (1960)
- 9) L. Svennerholm, Acta chem. scand. 17,239 (1963)
- 10) L. Svennerholm, J. Neurochem. 10,613 (1963)
- 11) J.R. Wherrett, J.A. Lowden, L.S. Wolfe, Canad. J. Biochem.  
42,1057 (1964)
- 12) R. Kuhn, U. Wiegandt, Chem. Ber. 96,866 (1963)
- 13) E. Klenk, W. Gielen, Hoppe-Seylers Z. 319,284 (1960)
- 14) L. Svennerholm, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9,436 (1962)
- 15) R. Kuhn, H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 18b,541 (1963)
- 16) R. Kuhn, H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 19b,256 (1964)
- 17) H. Wiegandt, G. Baschang, Z. Naturforsch. 20b,164 (1965)
- 18) K. Suzuki, J. Neurochem. 12,969 (1965)
- 19) E. Klenk, G. Padberg, Z. physiol. Chem. 327,249 (1962)
- 20) L. Svennerholm, Acta chem. scand. 17,860 (1963)
- 21) L. Svennerholm, Acta chem. scand. 19,1506 (1965)
- 22) E. Martensson, Acta chem. scand. 17,1074 (1963)
- 23) E. Martensson, Acta chem. scand. 17,2356 (1963)
- 24) E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. 288,220 (1951)
- 25) E. Svennerholm, L. Svennerholm, Acta chem. scand. 16,1282  
(1962)
- 26) E. Svennerholm, L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta 70,  
432 (1963)
- 27) A. Makita, T. Yamakawa, J. Biochem. (e.;Jap.) 55,365 (1964)
- 28) A. Makita, J. Biochem. (e.;Jap.) 55,269 (1964)
- 29) A. Makita, T. Yamakawa, J. Biochem. (e.;Jap.) 51,124 (1962)
- 30) T. Yamakawa, S. Yokoyama, N. Kise, J.Biochem. (e.;Jap.)  
52,228 (1962)

- 31) L. Wolfe, J. Biochem. 79,348 (1961)
- 32) E. Gray, V. Whittaker, J. Anat. (Brit.) 96,79 (1962)
- 33) V. Whittaker, I. Michaelson, R.J. Kirkland, J. Biochem. 90,  
293 (1964)
- 34) J. Eichberg, V. Whittaker, R. Dawson, J. Biochem. 92,91 (1964)
- 35) S. Bogoch, M. Paasonen, U. Trendelenburg, Brit. J. Pharmacol.  
18,325 (1962)
- 36) S. Bogoch, Virol. 4,458 (1957)
- 37) S. Bogoch, P. Lynch, A. Levine, Virol. 7,161 (1959)
- 38) W. Van Heyningen, J. gen. Microbiol. 20,291 (1959a)  
W. Van Heyningen, J. gen. Microbiol. 20,301 (1959b)  
W. Van Heyningen, J. gen. Microbiol. 20,310 (1959c)
- 39) R.M. Burton, Y.M. Balfour, Biochem. Pharmacol. 11,974 (1962)
- 40) J. Mellanby, W. Van Heyningen, V. Whittaker, J. Neurochem.  
12,77 (1965)
- 41) E. North, G. Pawlyszn, H. Doery, Aust. J. exper. Biol. 39,259  
(1961)
- 42) H. Doery, E. North, Aust. J. eper.Biol. 39,333 (1961)
- 43) J. Lowden, L. Wolfe, Canad. J. Biochem. 42,1587 (1964)
- 44) L. Svennerholm, Acta Soc. Med. Upsalien. 62,1 (1957)
- 45) H. McIlwain, Chemical Exploration of the Brain, Elsevier  
Publishing Co., Amsterdam 1963.
- 46) J. Lowden, L. Wolfe, Canad. J. Biochem. 42,1703 (1964)
- 47) R.M. Burton, R.E. Howard, S. Baer, Y.M. Balfour, Biochim.  
Biophys. Acta 84,441 (1964)
- 48) R.M. Burton, Int. J. Neuropharmacol. 3,13 (1964)
- 49) R.E. Howard, R.M. Burton, Biochem. Pharmacol. 13,1677 (1964)
- 50) N. Radin, F. Martin, J. Brown, J. biol. Chem. 224,499 (1957)
- 51) R.M. Burton, L. Garcia-Bunuel, M. Golden, Y.M. Balfour,  
Biochem. 2,580 (1963)
- 52) K. Suzuki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16,88 (1964)
- 53) K. Suzuki, S. Korey, J. Neurochem. 11,647 (1964)
- 54) Y. Kishimoto, W. Davies, N. Radin, J. Lipid Res. 6,525 (1965)
- 55) H. Jatzkewitz, Hoppe-Seylers Z. 318,275 (1960)
- 56) J. Escola Pico, Arch. Psychiat. Nervenkrankheit 202,95 (1961)
- 57) J. Escola Pico, Acta Neuropathologica 3,309 (1964)
- 58) J. Escola Pico, Acta Neuropathologica 3,289 (1964)

- 59) S. Samuels, S. Korey, J. Gonatas, R. Terry, M. Weiss, J. Neuropathol. 22,81 (1963)
- 60) N. Gonatas, J. Gonatas, J. Neuropathol. 24,318 (1965)
- 61) B. Volk, B. Wallace, L. Schneck, A. Saifer, Arch. Pathol. 78,483 (1964)
- 62) H. Jatzkewitz, K. Sandhoff, Biochim. Biophys. Acta 70,354 (1963)
- 63) H. Jatzkewitz, H. Pilz, K. Sandhoff, J. Neurochem. 12,135 (1965)
- 64) A. Saifer, M. Robin, B. Volk, J. Neurochem. 10,577 (1963)
- 65) R. Ledeen, K. Salsman, J. Gonatas, A. Taghavy, J. Neuropathol. 24,341 (1965)
- 66) R. Ledeen, K. Salsman, Biochem. 4,2225 (1965)
- 67) D. Booth, H. Goodwin, J. Cumings, J. Lipid Res. 7,337 (1966)
- 68) C. Hale, Nature 157,802 (1946)
- 69) R. Mowry, Lab. Invest. 7,566 (1958)
- 70) G. Gasic, L. Berwick, J. Cell Biol. 19,223 (1962)
- 71) R. Curran, A. Clark, D. Lovell, J. Anat. 99,427 (1965)
- 72) E. Stahl, U. Kaltenberg, J. Chromatog. 5,351 (1961)
- 73) V. Whittaker, M. Sheridan, J. Neurochem. 12,363 (1965)
- 74) E. Reynolds, J. Cell Biol. 17,208 (1963)
- 75) R. Terry, S. Korey, Nature, London, 188,1000 (1960)
- 76) H. Wiegandt, J. Neurochem. 14,671 (1967)

Meinem Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. Jatzkewitz

danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine Unterstützung bei ihrer Durchführung.

Herrn Doz. Dr. Dr. H. Hager verdanke ich die Erlernung der elektronenmikroskopischen Methodik.

Herrn Dr. K. Blinzinger danke ich für wertvolle Kritik und Unterstützung.

## L e b e n s l a u f

Am 30. November 1942 wurde ich in Athen/Griechenland geboren, Sohn des Apothekers Elefterios Halaris und seiner Ehefrau Elli, geb. Georgiadou. Ich besuchte die Volksschule und das humanistische Gymnasium des "Kollegion Athinon", wo ich im Juni 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im November 1961 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München, an der ich im April 1964 die ärztliche Vorprüfung und im April 1967 die ärztliche Prüfung ablegte.

Im Mai 1964 erhielt ich von Herrn Professor Dr. H. Jatzkewitz das Thema zu meiner Doktorarbeit, deren experimenteller Teil im Oktober 1966 abgeschlossen wurde.









